

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-330608

(P2001-330608A)

(43) 公開日 平成13年11月30日 (2001. 11. 30)

| (51) Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | テーマコード* (参考) |
|---------------------------|------|----------------|--------------|
| G 0 1 N 33/53 | | G 0 1 N 33/53 | M |
| C 1 2 M 1/00 | | C 1 2 M 1/00 | A |
| C 1 2 N 15/09 | | C 1 2 Q 1/68 | A |
| C 1 2 Q 1/68 | | G 0 1 N 33/545 | Z |
| G 0 1 N 33/545 | | 33/552 | |

審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 9 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-74208 (P2001-74208)

(22) 出願日 平成13年3月15日 (2001. 3. 15)

(31) 優先権主張番号 特願2000-74490 (P2000-74490)

(32) 優先日 平成12年3月16日 (2000. 3. 16)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000003078

株式会社東芝

東京都港区芝浦一丁目1番1号

(72) 発明者 橋本 幸二

神奈川県川崎市幸区小向東芝町1番地 株

式会社東芝研究開発センター内

(74) 代理人 100058479

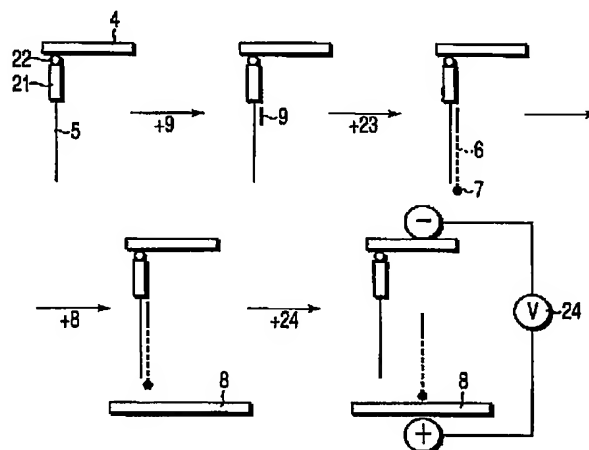
弁理士 鈴江 武彦 (外6名)

(54) 【発明の名称】 核酸鎖固定化担体の製造方法

(57) 【要約】

【課題】 本発明は簡易かつ低コストでDNAアレイを製造する方法を提供する。

【解決手段】 鋳型基板上に固定された核酸プローブ鋳型鎖を用い、該鋳型鎖に沿って核酸プローブ鎖を合成し、この合成されたプローブを、電界を利用して別のアレイ基板上に固定することにより、簡易かつ低コストで核酸鎖固定化アレイを製造する。アレイ基板を電極で形成することにより、電気的なDNA検出が可能なDNAアレイを得る。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 所定の塩基配列をもった第 2 核酸鎖を第 2 基板上に固定した核酸鎖固定化担体を製造する方法であって：第 1 基板上に、前記第 2 核酸鎖の塩基配列に対して相補的な塩基配列を有する第 1 核酸鎖を固定化した第 1 核酸鎖固定化担体を準備する工程と、核酸鎖合成溶液中において、前記第 1 核酸鎖固定化担体の第 1 核酸鎖に沿って、これに相補的な配列を有する第 2 核酸鎖を合成する工程と、前記第 1 基板の第 1 核酸鎖側に対面させて前記第 2 基板を配置する工程と、該第 2 基板から前記第 1 基板に向かう電界を印加することにより、前記第 1 核酸鎖に沿って合成された第 2 核酸鎖を前記第 2 基板表面に泳動させて、前記第 2 基板表面に結合させる工程とを具備した方法。

【請求項 2】 合成された前記第 2 核酸鎖を前記第 2 基板表面に泳動させて、第 2 基板表面に結合させる工程は、電解質溶液中において、二本鎖核酸が一本鎖に変性する条件で行われることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 前記第 2 基板から前記第 1 基板に向かう電界を印加するために、前記第 2 基板および前記第 1 基板の外側に一對の電極を設け、この電極対に電位を加えることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】 前記第 2 基板から前記第 1 基板に向かう電界を印加するために、前記第 1 基板および前記第 2 基板の少なくとも一方として電極材料表面を有する基板電極を用い、該基板電極に電位を加えることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】 前記電極基板は、絶縁基板上に電極膜を被覆し、該電極膜の表面を絶縁層領域で複数の電極領域に分離したものであり、分離された夫々の電極領域に、夫々異なった配列の第 1 核酸鎖または第 2 核酸鎖を固定することを特徴とする請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】 前記第 1 基板および前記第 2 基板の少なくとも一方が合成樹脂製あるいはガラス製の基板または膜である請求項 3 に記載の方法。

【請求項 7】 第 1 もしくは第 2 核酸鎖が、RNA、DNA、FNA およびこれらの類似化合物からなる群から選択される請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】 前記第 2 核酸鎖と前記第 2 基板との間の結合は、共有結合、親和性結合および静電的結合からなる群から選ばれる結合を介して行われる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】 前記基板電極の電極材料表面が金からなり、前記第 1 核酸鎖と前記第 2 基板との間の結合は、前記第 2 核酸鎖に結合された硫黄と前記金表面との間の親和性結合を介して行われる請求項 4 に記載の方法。

【請求項 10】 前記核酸鎖合成溶液は、プライマー、核酸合成酵素、ヌクレオチドモノマー及び電解質を含有

する請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】 前記二本鎖核酸が一本鎖に変化する条件は、前記電解質溶液の温度が 90℃以上である請求項 2 に記載の方法。

【請求項 12】 前記第 2 の核酸鎖を第 2 基板上に固定した核酸鎖固定化担体は遺伝子検査に用いられ、前記第 2 の核酸鎖はプローブである請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、所定の塩基配列をもった多数の核酸プローブを基板上に植設した、核酸鎖固定化担体を製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 最近、DNA アレイによる遺伝子検査技術が注目を集めている (Beattie et al. 1993, Fodor et al. 1991, Khrapko et al. 1989, Southern et al. 1994)。この DNA アレイは、数 cm 角の硝子基板またはシリコン基板の表面に、配列が異なる $10^4 \sim 10^5$ 種類の DNA プローブを固定化してなる担体からなっており、近年の遺伝子解析技術の発展に極めて大きく寄与している。その原理の概略は次の通りである。

【0003】 まず、DNA アレイ上において、その DNA プローブと蛍光色素もしくは放射線同位元素 (R) 等で標識した試料遺伝子とを反応させることにより、DNA プローブの塩基配列に対して相補的な配列を有する試料遺伝子を、DNA プローブに結合させる。これにより、試料遺伝子がアレイ上の DNA プローブに対して相補的な配列を有する際には、アレイ上の特定部位で前記標識に由来する信号が得られる。従って、固定化しておいた DNA プローブの配列と位置が予め分っていれば、試料遺伝子中に存在する塩基配列を簡単に調べることができる。また、DNA アレイを用いれば、1 回の試験を行うだけで塩基配列に関する多くの情報が得られることから、単なる遺伝子検出技術に止まらず、シーケンシング技術としても大いに期待されている (Pease et al. 1994, Parinov et al. 1996)。

【0004】 一方、アレイ上への DNA プローブの固定化に関しては、(1) アレイ上で DNA プローブの DNA 鎖を単位ヌクレオチド毎に逐次延長する方法 (米国特許第 5,889,165 号)、(2) 予め合成しておいた DNA プローブをアレイ上に固定化する方法 (米国特許第 5,807,522 号) の 2 種類が報告されている。前者の方法はフォトリソグラフィ技術を利用して、1/2 インチ角のアレイ内に、配列の異なる DNA プローブを 100Å の間隔で $20 \times 20 \mu m$ 毎に固定化できるので、約 4×10^5 種類のプローブからなるアレイを作製できる (Chee et al. 1996)。フォトリソグラフィ技術は、現在 0.1 μm 程度のバターンングも可能になりつつあることから、今後更にプローブの集積化が進む可能性もある。また、後者の方法は、予め多種類のプローブを用意する必要があること、プローブの集積度が前者の

方法より低い(120 μ mの間隔で60 \times 60 μ m毎)等の問題は
あるものの、ゲルのマトリックス内に3次元的にプロー
ブを固定化できるので、反応効率の点では優れている(G
uschin et al. 1997)。また、ゲルの代わりに、多孔質
のシリコンに3次元的にプローブを固定化する方法も報
告されている(Beattie et al. 1995)。

【0005】上記のように、DNAアレイは1回の試験で
複数の情報が得られる等の利点を有しているが、その作
製には複雑な反応制御が必要なため、従来のDNAアレイ
は非常に高価なものであった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記の問題
点を解決するためになされたものであり、その目的は、
従来のDNAアレイ作製技術を改良して、コスト、簡便
性、感度の点で優れた核酸鎖固定化担体を提供すること
を可能にすることである。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明では、上記目的を
達成するために、第1基板上に固定された第1核酸鎖を
いわゆる鋳型として用いて核酸プローブ鎖となる第2核
酸鎖を合成し、この合成された第2核酸鎖を、電界を利用
して別の第2基板上に固定することにより、核酸鎖固定
化担体を製造することとした。

【0008】即ち、本発明は、所定の塩基配列をもった
第2核酸鎖を第2基板上に固定した核酸鎖固定化担体を
製造する方法であって：第1基板上に、前記第2核酸鎖
の塩基配列に対して相補的な塩基配列を有する第1核酸
鎖を固定化した第1核酸鎖固定化担体を準備する工程
と、核酸合成溶液中において、前記第1核酸鎖固定化担
体の第1核酸鎖に沿って、これに相補的な配列を有する
第2核酸鎖を合成する工程と、前記第1基板の第1核酸
鎖側に対面させて前記第2基板を配置する工程と、該第
2基板から前記第1基板に向かう電界を印加すること
により、前記第1核酸鎖に沿って合成された第2核酸鎖を
前記第2基板表面に泳動させて、前記第2基板表面に固
定化する工程とを具備したことを特徴とするものであ
る。

【0009】本発明において、前記電界を印加する手段
として一対の電極を用いる。この電極は、前記第1基板
および前記第2基板の外側に配置して用いる。或いは、
前記第1基板および/または前記第2基板を電極材料で
形成することにより、電極と基板とを一体化した基板電
極としてもよい。

【0010】本発明において、核酸プローブ鎖は複数あ
り、それらは同じ配列を有するものであってもよいが、
好ましくは、夫々が異なった配列を有する。その場合、
前記基板電極を用いるときは、基板電極の表面を絶縁層
で多数の電極領域に分割し、夫々の電極領域に異なった
核酸プローブ鎖を固定する。あるいは同一の電極上に異
なったプローブ鎖を固定化することもできる。

【0011】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。

【0012】本発明において、前記第2核酸鎖は、RNA、
DNA、PNA (peptide nucleic acid)、更にこれらの類
似化合物の何れであってもよいが、好ましくはDNAであ
る。また、前記第1核酸鎖は特に限定されるものではな
く、合成オリゴヌクレオチド、cDNA、RNA、PNA、メチル
ホスホネート核酸等を用いることができる。

【0013】本発明の第1基板および第2基板におい
て、基板の形状は板状に限定されるものではない。ま
た、使用する基板材料も特に限定されない。例えば、ガ
ラス、石英ガラス、アルミナ、サファイア、フォスフェ
ライト、炭化珪素、酸化珪素、窒化珪素などの無機絶縁
材料を使用できる。また、ポリエチレン、エチレン、ポリ
プロピレン、ポリイソブチレン、ポリエチレンテレフ
タレート、不飽和ポリエステル、含フッ素樹脂、ポリ塩
化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリ酢酸ビニル、ポリ
ビニルアルコール、ポリビニルアセタール、アクリル樹
脂、ポリアクリロニトリル、ポリスチレン、アセタール
樹脂、ポリカーボネート、ポリアミド、フェノール樹
脂、ユリア樹脂、エポキシ樹脂、メラミン樹脂、スチレ
ン・アクリロニトリル共重合体、アクリロニトリルブタ
ジエンスチレン共重合体、シリコン樹脂、ポリフェニ
レンオキサイド、ポリスルホン等の有機材料を用いるこ
とができる。更に、ニトロセルロース膜、PVDF膜な
ど、核酸プロットングに使用される膜を用いることも
できる。また、以下で説明する電極材料を使用して、基
板と電極とを兼用した基板電極とすることもできる。こ
のような基板電極の場合、基板電極の表面を絶縁層領域
で分離し、分離された夫々の電極領域に、夫々異なった
核酸鎖を固定するのが好ましい。

【0014】電極材料は特に限定されるものではない。
例えば、金、金の合金、銀、プラチナ、水銀、ニッケ
ル、パラジウム、シリコン、ゲルマニウム、ガリウム、
タングステン等の金属単体及びそれらの合金、あるいは
グラファイト、グラシーカーボン等の炭素等、またはこ
れらの酸化物、化合物を用いることができる。更に、酸
化珪素等の半導体化合物や、CCD、FET、CMOSなど各種半
導体デバイスを用いることも可能である。

【0015】絶縁基板上に電極膜を形成し、基板と電極
とを一体化した基板電極を用いる場合、この電極膜は、
メッキ、印刷、スパッタ、蒸着などで作製することがで
きる。蒸着を行う場合は、抵抗加熱法、高周波加熱法、
電子ビーム加熱法により電極膜を形成することができ
る。また、スパッタリングを行う場合は、直流2極スパ
ッタリング、バイアススパッタリング、非対称交流スパ
ッタリング、ゲッタスパッタリング、高周波スパッタリ
ング等により電極膜を形成することが可能である。更
に、ポリピロール、ポリアニリンなどの電解重合膜や導
電性高分子も用いることが可能である。

【0016】本発明において、電極表面を分離するために用いられる絶縁材料は特に限定されるものではないが、フォトリソグラーフ材料であることが好ましい。レジスト材料としては、光露光用フォトリソグラーフ、遠紫外用フォトリソグラーフ、X線用フォトリソグラーフ、電子線用フォトリソグラーフが用いられる。光露光用フォトリソグラーフとしては、主原料が環化ゴム、ポリ桂皮酸、ノボラック樹脂であるものが挙げられる。遠紫外用フォトリソグラーフには、環化ゴム、フェノール樹脂、ポリメチルイソプロピルケトン（PMK）、ポリメチルメタクリレート（PMA）等が用いられる。また、X線用レジストには、COP、メタルアクリレートほか、薄膜ハンドブック（オーム社）に記載の物質を用いることができる。更に、電子線用レジストには、PMMA等上記文献に記載の物質を用いることが可能である。

【0017】ここで用いるレジストの膜厚は、100Å以上10mm以下であることが望ましい。フォトリソグラーフで電極を被覆し、リソグラフィーを行うことで、面積を一定にすることが可能になる。これにより、核酸鎖の固定化量がそれぞれの電極間で均一になり、再現性に優れた測定を可能にする。従来、レジスト材料は最終的には除去するのが一般的であるが、基板電極ではレジスト材料は除去することなく電極の一部として用いることも可能である。この場合は、用いるレジスト材料に耐水性の高い物質を使用する必要がある。電極上部に形成する絶縁層にはフォトリソグラーフ材料以外でも用いることが可能である。例えば、Si、Ti、Al、Zn、Pb、Cd、W、Mo、Cr、Ta、Ni等の酸化物、窒化物、炭化物、その他合金を用いることも可能である。これらの材料をスパッタ、蒸着あるいはCVD等を用いて薄膜を形成した後、フォトリソグラフィーで電極露出部のパターニングを行い、面積を一定に制御する。

【0018】本発明の方法にて得られる核酸鎖固定化担体は、その基板として基板電極を用いた場合、1つの素子上に幾つかの電極領域を構成し、その夫々に異なったプローブ核酸鎖を固定化することで、一度に数種類の標的に対して検査を行うことができる。また、1つの素子上に幾つかの電極部を構成し、同じプローブ核酸鎖を固定化することで、一度に数検体の検査を行うことも可能である。この場合、フォトリソグラフィーを利用して、予め基板上に複数の電極をパターニングしておく。この際、隣同士の電極が接触しないように、絶縁膜で仕切りを付けるのが有効である。仕切りの高さは0.1ミクロンから100ミクロン程度が望ましい。

【0019】前記第1核酸鎖を第1基板の表面に固定化した、いわゆる鋳型として作用する第1核酸鎖固定化担体の作製方法は、特に限定されるものではない。例えば、光学活性な試薬を用いたフォトリソグラフィーによる直接合成法や（Fodor et al. 1991）、予め作製した核酸鎖を、マイクロピペット、インクジェット等の方法で

第1基板上に滴下して固定化する方法を用いることができる。固定化する第1核酸鎖と第1基板の間にはスパーサーが存在することが好ましい。

【0020】次に、以上のようにして作製した核酸鎖合成用の鋳型となる第1核酸鎖固定化担体を、プライマー、核酸合成酵素およびヌクレオチドモノマー、電解質等を含む電解質溶液、即ち、核酸合成溶液中に浸漬し反応させることにより、第1核酸鎖に対して相補的な配列を有する第2核酸鎖の合成を行う。次いで、第2核酸鎖を固定化するための第2基板を用意し、電解質溶液中で第1基板の近傍あるいは隣接して、好ましくはこれに對面させて設置する。第1基板と第2基板との間隔は核酸鎖の長さによっても異なるが、核酸鎖の移動距離が約1mm以下となるよう接触させるか、あるいは10nmから1mmの間隔とすることが好ましい。続いて、電解質溶液を二本鎖DNAが変成する条件、例えば温度条件を好ましくは90°C以上にする。変性には酸化ナトリウムなどを含むアルカリ性溶液、尿素などを用いることも可能である。電位印加で変性させることもできる。この際、第2基板から第1基板に向かう電界が加わるように、第2核酸鎖を固定化するための第2基板にはプラスの電位を、第1基板にはマイナスの電位を印加する。このとき第1基板、第2番共に基板電極であることが必要である。電位勾配は0.1~100V/cm程度であることが望ましい。核酸鎖は一般に負に帯電しているから、この操作により、第1基板上で合成された第2核酸鎖は第2基板表面に移行して結合する。

【0021】この第2核酸鎖と第2基板表面との結合には、共有結合、親和性結合、または静電的結合などを含む当業者に周知の手段を使用することができる。即ち、第2核酸鎖の末端を、アミノ基、カルボキシル基、チオール基のような反応性の官能基；ビオチン、アビジン等の特異的親和性対を形成するタンパク質で修飾しておく、更に核酸鎖を固定化する第2基板の表面にも、シランカップリング剤等の反応性官能基を有する分子；ビオチン、アビジン等の特異的親和性対を構成するタンパク質；負に帯電したアミノ酸などで修飾を施しておくことによって、より強固に固定化することが可能になる。その際、基板と官能基との間に適当なスパーサー、例えば、ポリアセチレン、ポリピロール、ポリチオフェン、ポリアニリン等の導電性高分子や、アルキル基、ポリエチレン等を導入することで、検出の効率を向上させることも可能である。また、基板電極として金を使用する場合には、第2核酸鎖の末端に、金に対して大きな親和性を有する硫黄を結合しておくのが好ましい。

【0022】また、第1核酸鎖は、電極以外の材料、例えばガラス、シリコン、酸化珪素、窒化珪素、合成高分子、ニトロセルロース膜、ナイロン膜等からなる第1基板に固定化することも可能である。この場合、第1基板で合成した第2核酸鎖を第2基板上に移行させる段階

で、第2基板を電極とし、さらにもう一つの別の電極を用意し、その電極を、第1核酸鎖を固定化した第1基板を挟んで第2基板の反対側に設置し、第2基板との間に電位を印加すればよい。この際、第2基板をプラスに設定する。

【0023】合成した第2核酸鎖は電極以外の材料、例えばガラス、シリコン、酸化珪素、窒化珪素、合成高分子、ニトロセルロース膜、ナイロン膜等からなる第2基板に固定化することも可能である。この場合は、電極からなる第1基板上で合成した核酸鎖を第2基板に移行させる段階でもう一つの別の電極を用意し、その電極を第1基板と反対側に設置し、これと第1基板との間に電位を印加すればよい。この際第1基板をマイナスに設定する。

【0024】また、これらを組み合わせて、第1基板および第2基板の両者共に電極以外の材料を用いることも可能である。この場合は、第1基板および第2基板の外側にそれぞれ電極を設置し、第1基板の外側の電極から第2基板の外側の電極に向けて電位を印加すればよい。この際第2基板の外側の電極をプラスに設定する。

【0025】本発明において、第1核酸鎖から第2核酸鎖を合成するために用いる核酸合成酵素は特に限定されるものではなく、種々のDNA合成酵素、RNA合成酵素から選択することができる。

【0026】第1核酸鎖にcDNAを用いた場合には、ランダムプライマーで核酸鎖を合成することもできる。また、第1核酸鎖にオリゴヌクレオチドを用いた場合には、予め末端にポリベンジルグルタメート(PBLG)やポリエチレングリコール等のスパーサー分子を結合しておくことも可能である。更に、鋳型プローブ鎖の中に共通の配列を入れておくことで、その配列に相補的なプライマーを用いて核酸鎖の合成を行うことが可能になる。

【0027】本発明により製造された核酸固定化担体は、種々の遺伝子の検出に使用することができ、検出する遺伝子は特に限定されない。例えば、肝炎ウイルス(A、B、C、D、E、F、G型)、HIV、インフルエンザウイルス、ヘルペス群ウイルス、アデノウイルス、ヒトポリオマウイルス、ヒトパピローマウイルス、ヒトバルボウイルス、ムンプスウイルス、ヒトロタウイルス、エンテロウイルス、日本脳炎ウイルス、デングウイルス、風疹ウイルス、HTLV、等のウイルス感染症、黄色ブドウ球菌、溶血性連鎖球菌、病原性大腸菌、腸炎ビブリオ菌、ヘリコバクターピロリ菌、カンピロバクター、コレラ菌、赤痢菌、サルモネラ菌、エルシニア、淋菌、リステリア菌、レプトスピラ、レジオネラ菌、スピロヘータ、肺炎マイコプラズマ、リケッチア、クラミジア、マラリア、赤痢アメーバ、病原真菌、等の細菌感染症、寄生虫、真菌の検出に用いることができる。また、遺伝性疾患、網膜芽細胞腫、ウィルムス腫瘍、家族性大腸ポリポーシス、遺伝性非ポリポーシス大

腸癌、神経線維腫症、家族性乳ガン、色素性乾皮症、脳腫瘍、口腔癌、食道癌、胃ガン、大腸癌、肝臓癌、膵臓癌、肺ガン、甲状腺腫瘍、乳腺腫瘍、泌尿器腫瘍、男性器腫瘍、女性器腫瘍、皮膚腫瘍、骨・軟部腫瘍、白血病、リンパ腫、固形腫瘍、等の腫瘍性疾患を検査することが可能である。更に、RFLP、SNPs等の多型解析、塩基配列の解析等にも適応することが可能である。また、医療以外にも、食品検査、検疫、医薬品検査、法医学、農業、畜産、漁業、林業などで、遺伝子検査が必要なものに全て適応可能である。また、PCR、SDA、NASBA法等で増幅した遺伝子の検出に対しても用いることは可能である。更に、標的遺伝子は予め電気化学的に活性な物質や、FITC、ローダミン、アクリジン等の蛍光物質、アルカリホスファターゼ、パーオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ等の酵素、ハプテン、発光物質、抗体、抗原、金コロイドなどのコロイド粒子、金属、金属イオン更にはトリスビビリジン、トリスフェナントロリン、ヘキサミン等との金属キレート等で標識しておくことも可能である。

【0028】本発明により得られる核酸固定化担体を用いた遺伝子検出において、使用する試料は特に限定されず、例えば、血液、血清、白血球、尿、便、精液、唾液、組織、培養細胞、喀痰等を用いることができる。これら検体試料から核酸成分の抽出を行う。抽出方法は特に限定される物ではなく、フェノール-クロロホルム法等の液-液抽出法や担体を用いる固液抽出法を用いることができる。また、市販の核酸抽出方法QIAamp(QIAGEN社製)、スマイテスト(住友金属社製)等を利用することも可能である。

【0029】次に、抽出した核酸成分と遺伝子検出用担体との間でハイブリダイゼーション反応を行う。反応溶液は、イオン強度0.01~5の範囲で、pH5~10の範囲の緩衝液中で行う。この溶液中にはハイブリダイゼーション促進剤である硫酸デキストランや、サケ精子DNA、牛胸腺DNA、EDTA、界面活性剤などを添加することが可能である。これに抽出した核酸成分を添加し、90℃以上で熱変性させる。遺伝子検出用電極の挿入は、変性直後、あるいは0℃に急冷後に行うことができる。また、基板上に液を滴下することでハイブリダイゼーション反応を行うことも可能である。反応中は、攪拌、あるいは震盪などの操作で反応速度を高めることもできる。反応温度は10℃~90℃の範囲であり、また反応時間は1分以上から1晩程度行う。ハイブリダイゼーション反応後、電極を取り出し洗浄を行う。洗浄には、イオン強度0.01~5の範囲で、pH5~10の範囲の緩衝液を用いる。

【0030】本発明により得られる核酸固定化担体のうち、電極基板を用いた核酸固定化電極は、電気化学的に活性なDNA結合物質を用いた検出を行う場合に有用である。電気化学的に活性なDNA結合物質を用いた検出は、以下のような手順で検出を行う。核酸固定化アレイ

を洗浄後、電極基板表面に形成した二本鎖部分に選択的に結合するDNA結合物質を作用させ、電気化学的な測定を行う。ここで用いられるDNA結合物質は特に限定されるものではないが、例えば、ヘキスト33258、アクリジンオレンジ、キナクリン、ドウノマイシン、メタロインターカレーター、ビスアクリジン等のビスインターカレーター、トリスインターカレーター、ポリインターカレーター等を用いることが可能である。更に、これらのインターカレーターを電気化学的に活性な金属錯体、例えば、フェロセン、ピオロゲン等で修飾しておくことも可能である。DNA結合物質の濃度は、その種類によって異なるが、一般的には1 ng/ml ~ 1 mg/ml の範囲で使用する。この際、イオン強度0.001~5の範囲で、pH5~10の範囲の緩衝液を用いる。電極をDNA結合物質と反応させた後、洗浄し、電気化学的な測定を行う。電気化学的な測定は、3電極タイプ、すなわち参照電極、対極、作用極、あるいは2電極タイプ、すなわち対極、作用極で行う。

【0031】この測定では、DNA結合物質が電気化学的に反応する電位以上の電位を印加し、DNA結合物質に由来する反応電流値を測定する。この際、電位は定速で掃引するか、あるいはパルスで印加するか、あるいは、定電位を印加することができる。測定には、ポテンシオスタット、デジタルマルチメーター、ファンクションジェネレーター等の装置を用いて電流、電圧を制御する。得られた電流値を基に、検量線から標的遺伝子の濃度を算出する。遺伝子検出用電極を用いた遺伝子検出装置は、遺伝子抽出部、遺伝子反応部、DNA結合物質反応部、電気化学測定部、洗浄部等から構成される。

【0032】また、本発明により得られる核酸鎖固定化担体は、サンプルを予め蛍光標識するか、あるいはセカンドプローブとして蛍光標識した核酸鎖を用いることで、蛍光強度を指標に遺伝子の検出が可能になる。この際、蛍光顕微鏡など組み合わせて用いると、核酸鎖の集積度を高めることが可能になる。

【0033】以上のように、本発明に基づく核酸鎖合成方法を用いることで、同一担体上で連続的に配列の異なる核酸鎖を合成できるようになり、核酸鎖の合成操作が簡便になると共に、核酸鎖合成を低コストで行えるようになる。更に、本発明の方法で作製した核酸鎖固定化電極を用いれば、電気化学的な遺伝子検出が可能になり、簡便・高感度な核酸配列検査を行う事が可能になる。

【0034】

【実施例】以下、実施例により、本発明を更に詳細に説明する。

【0035】実施例1： 鋳型核酸鎖固定化フィルター固定化には、大腸菌のrDNAを増幅した断片1.5 kbと、合成DNAを用いた。rDNAについては2種類のサンプルを調製した。1つは、熱変性させた100μg/mL (0.2mol/Lの塩化ナトリウム、5mmol/Lの燐酸緩衝液 (pH7))

のrDNAで、もう一つはアルカリ変性させた100μg/mL (0.2mol/Lの水酸化ナトリウム) のrDNAである。また、合成DNAには20μg/mLの90merのオリゴヌクレオチド (10mmol/Lのリン酸緩衝液 (pH7)) を用いた。それぞれ1μLづつをナイロンフィルター上にスポットし、自然乾燥後、ハイブリダイゼーション緩衝液 (2xSSC 1mmol/LのEDTA (pH7)) で洗浄した。そして、80°Cのオーブンで1時間ベーキングを行った。

【0036】実施例2： 鋳型核酸鎖固定化電極固定化には、大腸菌のrDNAを増幅した断片1.5 kbと、合成DNAを用いた。rDNAについては2種類のサンプルを調製した。1つは、熱変性させた100μg/mL (0.2mol/Lの塩化ナトリウム、5mmol/Lの燐酸緩衝液 (pH7)) のrDNAで、もう一つはアルカリ変性させた100μg/mL (0.2mol/Lの水酸化ナトリウム) のrDNAである。また、合成DNAには20μg/mLの90merのデオキシオリゴヌクレオチド (10mmol/Lのリン酸緩衝液 (pH7)) を用いた。それぞれ0.2μLづつを5mm角の金電極上にスポットし自然乾燥させた。

【0037】実施例3： 鋳型核酸鎖固定化フィルター上での核酸鎖合成

核酸鎖を固定化した実施例1のナイロンフィルター上で核酸鎖の合成を行った。合成には、ファルマシア社製の核酸鎖標識キット (フルオレッセインイソチオシアネート: FITC) を用いた。ヌクレオチドミックスとランダムプライマー、ポリメラーゼ (klenow) からなる試薬100μLをフィルターに滴下し、ハイブリバッグ内で37°C、1時間反応させた。ブロッキング、洗浄の後、アルカリフォスファターゼ標識抗FITC抗体と1時間反応させた。洗浄後、発光基質CDP-Starを滴下したところ、DNAをスポットした部分のみから発光が見られ、フィルター上で核酸鎖の合成が可能であることがわかった。しかしながら、合成DNAのスポットからは発光が見られず、合成されていないと思われた。

【0038】実施例4： 鋳型核酸鎖固定化電極上での核酸鎖合成

核酸鎖を固定化した実施例2の5mm角の金電極上で核酸鎖の合成を行った。合成にはファルマシア社製の核酸鎖標識キット (フルオレッセインイソチオシアネート: FITC) を用いた。ヌクレオチドミックスとランダムプライマー、ポリメラーゼ (klenow) からなる試薬20μLを電極上に滴下し、乾燥しないように37°C、1時間反応させた。ブロッキング、洗浄の後、アルカリフォスファターゼ標識抗FITC抗体と1時間反応させた。洗浄後、発光基質CDP-Starを滴下したところ、DNAをスポットした部分のみから発光が見られた。また、金電極上では合成DNAのスポットからも発光が見られ、合成できることが確認された。

【0039】実施例5： 鋳型核酸鎖固定化フィルターからの転写

実施例4の方法で合成したナイロンフィルター上の核酸鎖を別のナイロンフィルターに転写した。まず、鋳型のナイロンフィルターを転写側のナイロンフィルターと接触させ、電気泳動槽に内に電界がかかるように配置した。電界の向きは鋳型側から転写側に向けてマイナス→プラスに設定した。約20V/cmの電位勾配で1分間転写を行った後、転写側のフィルターを80°Cでベーキングした。実施例4と同じ発光検出系を用いた結果、転写側にフィルターに合成した核酸鎖が転写されていることが確認できた。鋳型のフィルターは少なくとも3回繰り返し利用可能であった。

【0040】実施例6： 鋳型核酸鎖固定化金電極からの転写

実施例4の方法で合成した金電極上の核酸鎖をナイロンフィルターに転写した。まず、鋳型の金電極を転写側のナイロンフィルターと接触させ、電気泳動槽に内に電界がかかるように配置した。電界の向きは鋳型側から転写側に向けてマイナス→プラスに設定した。約10V/cmの電位勾配で3分間転写を行った後、転写側のフィルターを80°Cでベーキングした。実施例4と同じ発光検出系を用いた結果、転写側にはフィルター上で合成した核酸鎖が転写されていることが確認できた。鋳型の電極は少なくとも3回繰り返し転写が可能であった。

【0041】実施例7： 複製したフィルター上での核酸鎖の検出

核酸鎖を複製したフィルターを用いて遺伝子検出を行った。ターゲット遺伝子にはrDNAのPCR産物を用い、予めFITCで標識を行った。熱変性させたターゲット遺伝子100μLをフィルターに滴下し、ハイブリバッグ内において37°Cで1時間反応させた。ブロッキング、洗浄の後、アルカリフォスファターゼ標識抗FITC抗体と1時間反応させた。洗浄後、発光基質OP-Starを滴下したところ、DNAをスポットした部分のみから発光が見られ、複製したフィルター上で核酸鎖の検出が可能であることがわかった。電極から複製したフィルターでもほぼ同程度に検出が可能であった。

【0042】実施例8： 核酸鎖を固定化する電極の構造

図1は、本発明において、核酸鎖を固定化するために用いる第1及び第2の電極基板の一例を模式的に示す平面図である。同図において、参照番号1は、1cm角のガラス基板である。該基板1上には、100ミクロン角の金電極2が、30×30個のパターニングされている。各電極2の間は50ミクロンの絶縁膜3で仕切られており、各電極からはリード線（図示せず）が背面から取り出されている。

【0043】実施例9： 電極を使った核酸鎖の合成
図2は、電極基板を使った核酸鎖固定化アレイの製造工程と核酸合成のメカニズムの一例を模式的に示した説明図である。プローブ核酸鎖の鋳型になる第1核酸鎖5を

固定化した第1電極基板4は、図1の電極基板の各電極2つに、配列の異なる30merのオリゴヌクレオチド5の溶液を、マイクロピペットで滴下することにより作製した。オリゴヌクレオチド5の末端には、分子量1000のポリベンジルグルタメート（FBLG）21が予め結合されており、更に、FBLGの末端にはチオール基22が導入されている。

【0044】次に、第1核酸鎖を固定化した第1電極基板4を、dNTPs、DNA合成酵素23、およびプライマー9を含む溶液中に浸漬し、相補鎖6（第2核酸鎖）を合成した。合成時にはまずオリゴヌクレオチドにプライマー9が付着し、さらにDNA合成酵素23が作用して相補鎖6が合成される。合成した第2核酸鎖の末端にはチオール基7を導入した。

【0045】次に、この第1核酸鎖を固定化した第1電極基板4と、第2電極基板8をその金電極面が第1の電極基板の金電極面に対向するよう1μmの間隔をもって配置し、そのまま100mmol/Lのリン酸緩衝液中に浸漬した。95°Cに加熱しながら、第1電極基板4を対極として他方の第2電極基板8にプラス500mVの電位を印加した（24）。これにより第2基板から第1基板へ向かう方向の電界が発生した。この操作により、第2核酸鎖が第2基板へ移動し、チオール基7が金電極に付着して30×30個のパターン電極にそれぞれ異なる配列の第2核酸鎖を固定化することができた。第1核酸鎖を固定化した鋳型電極基板4は、少なくとも繰り返し50回は再使用可能であった。

【0046】実施例10： 電極上での間接的な核酸鎖の合成

図3は、電極基板を使って核酸固定化担体を製造するもう一つの例を模式的に示した説明図である。この実施例では、第1基板として、鋳型になる第1核酸鎖をガラス基板に固定化した第1ガラス基板10を用いる。この第1ガラス基板10は、異なるcDNA11溶液を、マイクロピペットを用いて30×30個のパターンで滴下することにより作製した。次に、第1核酸鎖を固定化した第1ガラス基板10を、dNTPs、DNA合成酵素25、ランダムプライマー12を含む溶液中に浸漬し、相補鎖（第2核酸鎖）13を合成した。合成した相補鎖の末端にはチオール基14を導入した。この第1ガラス基板10を間にして、実施例1で説明したのと同様の第2電極基板15ともう一つの電極16（対極）とをpH12のグリシン-NaOH緩衝液中に浸漬し、対極と第2電極基板間にプラス500mVの電位（対極に対して）を印加した（26）。この操作により、第1ガラス基板上で合成された第2核酸鎖は、30×30個のパターンの第2電極基板15上に移行し固定化することができた。この第1核酸鎖を固定化した第1ガラス基板10は、少なくとも繰り返し50回は再使用可能であった。

【0047】実施例11： 鋳型基板の複製

10

20

30

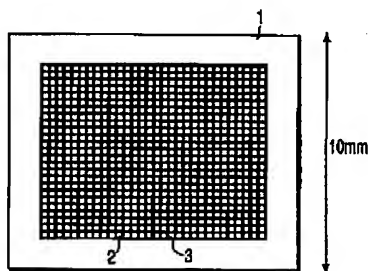
40

50

図4は鋳型基板(第1基板)の複製基板(第2基板)を作製する方法の一例を示した図である。鋳型になる第1核酸鎖を固定化したガラス基板(第1基板)は、異なるcDNA溶液をマイクロピペットで30×30個パターンに滴下して作製した。次に、第1核酸鎖を固定化したガラス基板をdNTPs、DNA合成酵素25、ランダムプライマーを含む溶液中に浸漬し、相補鎖(第2核酸鎖)を合成した。合成した相補鎖の末端には分子量1000のポリエチレングリコールを介してチオール基を導入した。第2基板は予めγ-アミノプロピルトリエトキシシラン処理を行った後N-(6-maleimidocaproyl oxy)succinimide、N-succinimide-6-maleimidohexanone(EMCS)処理を行い、基板表面にチオール反応性の官能基を導入した。第1基板の複製は、まず第1基板である鋳型のガラス基板と、第2基板である複製基板とを間にして、その両方の外側に電極を設置した。第1基板、第2基板及び2枚の電極を10mmol/L磷酸緩衝液(pH7)中に浸漬し、2枚の電極間にプラス500mVの電位(対極に対して)を印加しながら80°Cに加熱した。この操作で、第1基板上の合成した核酸鎖はそれぞれ30×30個パターンで第2基板上にS-S結合で固定化された。このようにして作製した鋳型の複製は、鋳型基板と同様に核酸鎖固定化基板の鋳型として使用することができ、少なくとも繰り返り50回は再使用可能であった。

【0048】なお、上記実施例9およびの方法において、10000プローブ核酸を植設したDNAアレイ1枚を製造するのに要する時間は、約5分であった。これに対して、従来の技術の項で説明した(1)アレイ基板上でDNAプローブのDNA鎖を単位ヌクレオチド毎に逐次延長する方法(米国特許第5,889,165号)では3日を要し、また

【図1】



る方法(米国特許第5,807,522号)では60分を要した。

【0049】

【発明の効果】本発明に基づく核酸鎖合成方法を用いることで、同一担体上で連続的に配列の異なる核酸鎖を合成できるようになり、核酸鎖の合成操作が簡便になると共に、核酸鎖合成を低コストで行えるようになる。更に、本発明の方法で作製した核酸鎖固定化電極を用いれば、電気化学的な遺伝子検出が可能になり、簡便・高感度な核酸配列検査を行う事が可能になる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の実施例において核酸鎖固定化アレイの製造に使用する電極基板を模式的に示した図である。

【図2】本発明の実施例により、電極を使って核酸鎖固定化アレイを製造する方法の一実施形態を示した図である。

【図3】本発明の実施例により、電極を使って核酸鎖固定化アレイを製造する方法のもう一つの実施形態を示した図である。

【図4】本発明により、電極を使って核酸鎖固定化アレイを製造する方法のもう一つの実施形態を示した図である。

【符号の説明】

1, 10...ガラス基板、2...金電極、3...絶縁層、4...鋳型電極、4, 8, 15...電極アレイ、5...オリゴヌクレオチド、6, 13...合成DNA、7, 14, 22...チオール基、9...プライマー、11...cDNA、12...ランダムプライマー、16...対極、21...スパーサー、23, 25...DNA合成酵素、24...熱+電位、26...アルカリ+電位

【図2】

